



## Sortase A 介导的(S)-羰基还原酶 II 寡聚体高效立体选择性转化(S)-苯基乙二醇

李坤鹏, 张荣珍\*, 李静, 刘海燕, 周丽仙, 李利宏, 李尧慧, 辜杨, 汪金珠, 邵佳佳, 全铭沁, 仇子玉, 徐岩

江南大学生物工程学院, 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

**摘要:**【目的】以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 sortase A 为“分子订书机”, 用于(S)-羰基还原酶 II 分子之间的连接, 获得催化功能与稳定性增强的氧化还原酶寡聚体, 高效催化 2-羟基苯乙酮, 合成(S)-苯基乙二醇。【方法】从 *S. aureus* 基因组中克隆 sortase A 基因, 在大肠杆菌中表达, 通过镍柱和凝胶层析纯化重组酶, 获得纯酶 sortase A。通过基因工程手段在(S)-羰基还原酶 II 的 C 末端添加 GGGGSLPETGG 序列, 蛋白纯化获得(S)-羰基还原酶 II-GGGGSLPETGG, 摸索了 sortase A 催化(S)-羰基还原酶 II-GGGGSLPETGG 的分子连接, 形成(S)-羰基还原酶 II 寡聚体的最佳条件, 并研究了寡聚体酶学性质及生物转化(S)-苯基乙二醇的效率。【结果】(S)-羰基还原酶 II 寡聚体比酶活力为 38.5 U/mg, 比原始型(S)-羰基还原酶 II 提高了 6 倍, 最适反应温度为 50 °C, 最适 pH 为 6.0, 在 50 °C 放置 1 h 后酶活仍旧保持 90%以上; 蛋白质变性实验结果显示, (S)-羰基还原酶 II 寡聚体的变性温度为 60.1 °C, 比原始酶提高了 10 °C; 生物转化结果显示(S)-羰基还原酶 II 寡聚体在 3 h 内完全转化 5 g/L 2-羟基苯乙酮, 产生光学纯度为 100%的(S)-苯基乙二醇, 相比于重组大肠杆菌(S)-羰基还原酶 II 全细胞催化时间缩短了 16 倍。【结论】本研究首次将 sortase A 应用于氧化还原酶的分子连接, 显著提高了酶的催化效率和热稳定性, 表明 sortase 在手性催化中有很大的潜在应用价值。

**关键词:** Sortase A, 分子连接, 寡聚体, 氧化还原酶, 手性催化

光学纯手性醇作为一类重要的中间体, 在药物、农用化学品、精细化学品以及一些特殊材料的合成中被广泛应用。羰基还原酶能够将内源性和外源性羰基化合物还原为手性醇, 该催化反应具有高度立体选择性的特点<sup>[1-3]</sup>, 相比于传统化学方法, 生物催化具有安全、绿色的优势, 因此羰

基金项目: 国家自然科学基金(31370100, 31670070); 江苏省六大人才高峰高层次人才项目(2015-SWYY-010); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP51409B); 教育部新世纪优秀人才(NCET-13-0833); 高等学校学科创新引智计划(111-2-06)

\*通信作者。Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85864112; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-12-29; 修回日期: 2017-03-15; 网络出版日期: 2017-04-05

基还原酶已越来越多地应用于化学和制药产业中<sup>[4-6]</sup>。来源于近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*) CCTCC M203011 的(S)-羰基还原酶 II(SCR II)能够催化 2-羟基苯乙酮(2-HAP)生成(S)-苯基乙二醇((S)-PED), 该手性化合物是许多药物和液晶材料合成必不可少的中间体<sup>[7]</sup>。然而, 重组菌株 *Escherichia coli*-SCR II 催化 2-HAP 的活性较低, 催化转化 5 g/L 2-HAP 为(S)-PED 需要 48 h。最近 SCR II 在 *C. parapsilosis* CCTCC M203011 中进行原位表达<sup>[8]</sup>, 重组菌株 *C. parapsilosis*-SCR II 催化 2-HAP 的酶活力提高了 2 倍, 不对称转化(S)-PED 的光学纯度和产率均高达 99%以上, 然而, 整个生物转化过程需要 24 h, 限制了其在手性催化中的应用。

sortase 是一类存在于革兰氏阳性菌中的转肽酶, 其功能与细菌菌毛蛋白组装和表面蛋白锚定有关<sup>[9]</sup>。来源于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 sortase A (SrtA)能识别带有 LPXTG(X 可以为任何氨基酸)的序列, 并且特异性地切开苏氨酸与甘氨酸之间的酰胺键形成一个硫酸酯中间体, 然后由位于细胞壁上的五聚甘氨酸来进攻这个硫酸酯中间体, 从而将 LPXT 序列与五聚甘氨酸相连, 实现了将蛋白质固定于细胞壁上<sup>[10-12]</sup>。目前 sortase 介导的连接反应已经广泛应用于蛋白质标记、环化和固定化等<sup>[13-15]</sup>。然而 sortase 应用于蛋白质与蛋白质分子之间的连接鲜有报道。Mao 等成功地将 sortase 用于绿色荧光蛋白之间的连接<sup>[16]</sup>, 认为 LPXT 序列与一个甘氨酸与五聚甘氨酸的连接效果相同。迄今为止, 还未有 sortase 介导的蛋白质互连用于连接氧化还原酶的手性催化。

本研究尝试将 sortase A 应用于 SCR II 自身分子连接(寡聚化), 通过基因工程在 SCR II 的 C 端添加 GGGGSLPETGG 序列(简称为 SCR II-mtf),

以其 N 端存在的天然甘氨酸作为亲核试剂, 在 sortase A 的介导下进行连接反应, 本研究对其连接产物的组成进行了分析, 考察了寡聚体的酶学性质, 获得了催化功能加强和稳定性显著提高的寡聚体, 高效催化(S)-PED 的不对称转化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒:** 本研究中使用的菌株、质粒及引物如表 1 所示。

**1.1.2 主要试剂:** *Taq* DNA polymerase、T4 DNA ligase、DNA marker、限制性内切酶、IPTG、基因组 DNA 提取试剂盒购于 TaKaRa 生物有限公司, 质粒提取和 DNA 回收试剂盒购于 OMEGA BIO-TEK。引物由上海生工生物工程有限公司合成。2-羟基苯乙酮、辅酶 NADPH 和(S)-苯基乙二醇购于 Sigma-Aldrich。其余试剂均为分析纯。

### 1.2 菌体培养

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0, 固体培养基添加 1.5%琼脂粉。将 *S. aureus* 和 *E. coli*/pET28a-*scrII*<sup>[7]</sup>菌种分别接种于装有 5 mL LB 液体培养基(无抗)和 5 mL LB 液体培养基(50 μg/mL 卡那霉素)的试管中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 10 h。

### 1.3 基因组 DNA 和质粒的提取

参照试剂盒说明书提取 *S. aureus* 的基因组 DNA 以及 *E. coli*/pET28a-*scrII* 的质粒。

### 1.4 Sortase A 和 SCR II-mtf 基因的获得

分别以 *srtA* 和 *scrII* 基因序列为模板, 通过 DNAMAN 软件设计引物如表 1 中所示(下划线为酶切位点)。以 *S. aureus* 基因组为模板, PCR 扩增

表 1. 实验菌株, 质粒和引物  
Table 1. Strains, plasmids and primers in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Source of <i>srtA</i>	This lab
<i>E. coli</i> /T- <i>scrII</i> -mtf	<i>E. coli</i> JM109 harboring T- <i>scrII</i> -mtf	This study
<i>E. coli</i> /T- <i>srtA</i>	<i>E. coli</i> JM109 harboring T- <i>srtA</i>	This study
<i>E. coli</i> /pET28a- <i>scrII</i>	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a- <i>scrII</i>	This study
<i>E. coli</i> /pET28a- <i>scrII</i> -mtf	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a- <i>scrII</i> -mtf	This study
<i>E. coli</i> /pET21a- <i>srtA</i>	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET21a- <i>srtA</i>	This study
Plasmids		
pMD19-T	Amp <sup>r</sup> , 2692 bp	TaKaRa
T- <i>scrII</i> -mtf	pMD19-T harboring 0.87 kb <i>scrII</i> -mtf gene, 3.5 kb	This study
T- <i>srtA</i>	pMD19-T harboring 0.4 kb <i>srtA</i> gene, 3.1 kb	This study
pET28a- <i>scrII</i> -mtf	pET28a harboring 0.87 kb <i>scrII</i> -mtf gene, 6.3 kb	This study
pET28a- <i>scrII</i>	pET28a harboring 0.84 kb <i>scrII</i> gene, 6.2 kb	This lab [7]
pET21a- <i>srtA</i>	pET21a harboring 0.4 kb <i>srtA</i> gene, 5.8 kb	This study
Primers		
Sequence (5'→3')		
<i>srtA</i> _F	<u>CGCCATATG</u> CAAGCTAAACCTCAAATTC ( <i>Nde</i> I)	
<i>srtA</i> _R	CCG <u>CTCGAG</u> TTTGACTTCTGTAGCTAC ( <i>Xho</i> I)	
<i>scrII</i> -mtf_F	<u>CCCATGGG</u> CGAAATCGAATC ( <i>Nco</i> I)	
<i>scrII</i> -mtf_R	<u>CCCTCGAG</u> GCCGCGGTTTCCGGAAGGC ( <i>Xho</i> I) TGCCACCGCCACCTGGACAAGTGTAACCACCATC	

The restriction endonuclease sites are underlined.

*srtA* 基因, 条件为: 98 °C 1 min; 98 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 次循环; 72 °C 10 min。以 pET28a-*scrII* 质粒为模板, PCR 扩增 *scrII*-mtf 基因, 条件为: 98 °C 1 min; 98 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 次循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经胶回收纯化后, 连接至 pMD19-T 上, 连接产物转化 *E. coli* JM 109 感受态细胞, 涂布于 LB 固体培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素), 获得阳性克隆后提取质粒。

### 1.5 表达载体的构建

使用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I 分别对载体 pET-21a 和质粒 T-*srtA* 进行双酶切, 酶切后回收 DNA 片段通过粘性末端连接获得带有 *srtA* 的重组表达质粒 pET21a-*srtA*。同时, 用 *Xho* I 和 *Nco* I

分别对载体 pET-28a 和 T-*scrII*-mtf 进行双酶切, 获得的 DNA 片段连接后获得带有 *SCR*II-mtf 的表达质粒 pET28a-*scrII*-mtf。重组质粒由上海生工生物工程有限公司进行测序。

### 1.6 重组菌株的构建

将重组质粒 pET21a-*srtA* 和 pET28a-*scrII*-mtf 转化感受态细胞 *E. coli* (DE3) 菌株, 从氨苄青霉素抗性平板上筛选出重组菌株 *E. coli*/pET21a-*srtA*, 从卡那霉素抗性平板上筛选出 *E. coli*/pET28a-*scrII*-mtf 阳性克隆。

### 1.7 蛋白纯化

从平板上挑取 *E. coli*/pET21a-*srtA*、*E. coli*/pET28a-*scrII*-mtf、*E. coli*/pET28a-*scrII* 单菌落分别接种于含对应抗性的 100 mL LB 液体培养基

中, 当菌体培养的  $OD_{600}$  值达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 诱导剂 IPTG, 30 °C 诱导表达 10 h。将诱导表达后的菌液离心, 收集菌体, 用生理盐水洗涤 3 次后重悬于 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 超声破碎。12000 r/min, 4 °C 离心收集上清液, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后的滤液即为粗酶液。利用镍离子亲和层析柱和 Superdex 200 凝胶柱两个纯化步骤, 对 SrtA、SCR II 和 SCR II-mtf 进行纯化, 具体参考张荣珍等方法<sup>[17]</sup>。

### 1.8 SrtA 介导 SCR II-mtf 寡聚化

向连接体系 (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.5) 中加入 SrtA (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 SCR II-mtf (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别在 10、15、20、25、30 和 35 °C 的条件下进行反应, 同时, 在相同的体系中加入同等量的 SrtA 和 SCR II 作为对照, 反应时间为 8 h。连接产物经 SDS-PAGE 分析后确定最佳连接温度。在最佳温度下将反应进行 12、24、36 h, 观察连接产物产量的变化, 确定连接时间。连接反应结束后, 将连接体系超滤浓缩至 500  $\mu\text{L}$ , 用 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0 的缓冲平衡凝胶柱 Superdex 200, 接下来将浓缩后的样品过柱, 根据分子筛效应分离得到 SCR II 寡聚体, SDS-PAGE 鉴定连接产物的纯度, 连接产物条带切下后用于 MALDI-TOF-MS 分析, 获得的质谱数据利用 Mascot 搜索引擎 (www.matrixscience.com) 进行鉴定, 以确定连接产物的成分。

### 1.9 酶活力测定

辅酶 NADPH 被还原后, 会引起 340 nm 的吸光度的降低。因此可通过测定反应过程中 340 nm 处吸光度的变化来衡量氧化还原酶的活力。酶活测定体系: 100  $\mu\text{L}$  体系中含有 100 mmol/L 磷酸钾

缓冲液 (pH 6.0), 0.5 mmol/L NADPH, 5 mmol/L 2-HAP, 35 °C 恒温 3 min, 加入适量酶液混匀后, 酶标仪扫描 340 nm 处的吸光值变化。酶活测定实验重复 3 次, 取平均值。蛋白含量采用 Bradford 法测定<sup>[18]</sup>, 以 BSA 为标准蛋白。定义 1 个酶活单位 (U) 为每分钟催化氧化 1  $\mu\text{mol}$  辅酶 NADPH 的酶量 (公式 1、2)。

$$\text{酶活 (U)} = EW \times V \times 10^3 / (6220 \times 0.3) \quad \text{公式 (1)}$$

$$\text{比活 (U/mg)} = \text{酶活 (U)} / \text{蛋白量 (mg)} \quad \text{公式 (2)}$$

其中,  $EW$ : 1 min 内 340 nm 处吸光度的变化;  $V$ : 反应液的体积 (mL); 6220: 摩尔消光系数 [ $\text{L}/(\text{mol} \times \text{cm})$ ]; 0.3: 光程距离 (cm)。

### 1.10 酶学性质测定

对分别在不同温度梯度 (20–70 °C) 和 pH 梯度 (4.0–9.0) 下测定 SCR II、SCR II-mtf 及 SCR II 寡聚体的酶活, 确定三者的最适 pH 和最适温度。将 3 种酶置于 50 °C 下并在不同时间间隔取样进行酶活的测定, 评估温度稳定性。在 4 °C 条件下将 3 种酶放置在不同 pH 梯度 (4.0–9.0) 的缓冲溶液中, 24 h 后测定酶活, 确定三者的 pH 耐受性。

### 1.11 不对称转化

用 SCR II、SCR II-mtf、SCR II 寡聚体分别转化 2-HAP, 对比转化结果。反应体系: 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0), 5 g/L 2-HAP 或 10 g/L 2-HAP 和等摩尔的 NADPH, 以及适量的纯酶液, 总体积 2 mL。在 35 °C、200 r/min 条件下反应 10 h, 每隔 0.5 h 取 1 次样, 乙酸乙酯萃取后取液相部分检测转化结果。每个实验重复 3 次取平均值。

### 1.12 圆二色谱分析

三种纯化蛋白用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 稀释至 0.1 mg/mL, 应用 Jasco J720 光谱仪在 25 °C 条件下进行二级结构测定, 光谱值范围

为 190–250 nm, 扫描速度 50 nm/min, 带宽 2 nm, 反应时间 1 s, 读数 30 次, 取信号平均值并基线校正, 将所测定的 CD 值转换成摩尔椭圆度(molar ellipticity)  $\theta$  ( $\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ ), 用计算机专用软件 (J-700 for Windows Secondary Structure Estimation, Version 1.10.00) 分析各蛋白二级结构组成。取上述制备好的样品, 分别加入 1 mm 比色皿中, 以  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的速度将蛋白溶液从  $20^\circ\text{C}$  加热至  $80^\circ\text{C}$ , 波长 209 nm, 用圆二色谱仪记录摩尔椭圆度随温度的变化, 考察三种蛋白随温度升高解螺旋情况, 确定蛋白质变性温度。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组质粒 pET21a-srtA 和 pET28a-scrII-mtf 的构建

以 *S. aureus* 基因组为模板, 以 *srtA*\_F 和 *srtA*\_R 为引物进行 PCR 扩增, 获得目的基因 *srtA*, 经过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 其条带大小为 0.6 kb。将 *srtA* 片段连入 pMD19T, 经 *Xho* I 和 *Nde* I 双酶切后连入 pET21a 载体。以 *scrII*-mtf\_F 和 *scrII*-mtf\_R 为引物, 从 pET28a-*scrII* 质粒上扩增出 *scrII*-mtf 基因, 电泳分析结果表明基因片段大小接近 0.9 kb。将 *scrII*-mtf 片段连入 pMD19-T, 经 *Xho* I 和 *Nco* I 双酶切后连入 pET28a 载体。两种重组质粒均经双酶切鉴定后转入 *E. coli* BL21 (DE3), 挑取阳性克隆提取质粒并送去测序, 测序结果显示两种基因均已克隆到相应表达载体上, 获得重组质粒 pET21a-*srtA* 和 pET28a-*scrII*-mtf。

### 2.2 SrtA、SCR II 和 SCR II-mtf 的表达及纯化

挑取 *E. coli* BL21/pET21a-*srtA*、*E. coli*/pET28a-*scrII*、*E. coli* BL21/pET28a-*scrII*-mtf 的单菌落至含相应抗性的 LB 液体培养基中培养, 经 IPTG 诱导

后收集菌体, 洗涤后重悬于 Tris-HCl 缓冲液中, 超声破碎、离心、过膜得到粗酶液。然后将粗酶液用 Ni 柱和 Superdex 200 两个步骤进行分离纯化, 经 SDS-PAGE 分析, 3 种重组蛋白纯化后获得的目的蛋白条带均一, 大小分别约为 23 kDa (SrtA)、32 kDa (SCR II)、33 kDa (SCR II-mtf), 与理论分子量大小一致(图 1 和图 2)。纯化蛋白可用于后续的连接反应及酶学性质分析。

### 2.3 SrtA 介导 SCR II 分子连接的最佳条件的确定

在  $\text{Ca}^{2+}$  存在的情况下, 向 Sortase 介导的连接反应体系中加入 SrtA 和 SCR II-mtf, 分别在不同温度下反应 8 h, 同时设置 SrtA+SCR II 为对照组, SDS-PAGE 检测结果如图 3 所示, 不同温度下均有连接产物生成, 肽指纹图谱显示与连接产物匹配度最高的是来自于 *Candida parapsilosis* 的 stereospecific carbonyl reductase 2, 即本研究中的 SCR II, 根据大小可以判断连接产物的成分主要是

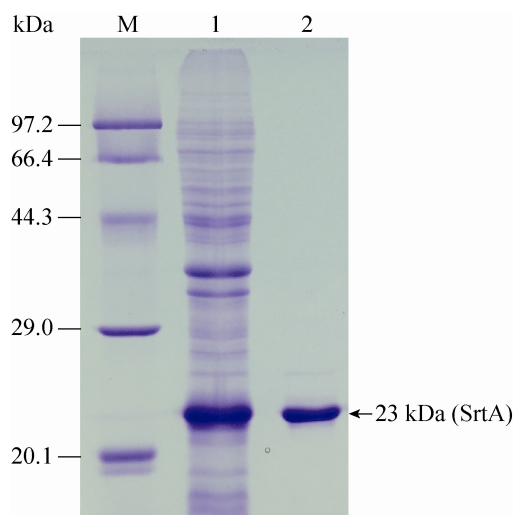


图 1. SrtA 的表达与纯化

Figure 1. Expression and purification of SrtA. M: protein molecular weight marker (Low); Lane1: the cell-free extracts of the recombinant *E. coli* BL21/pET-*srtA*; lane2: the purified SrtA.



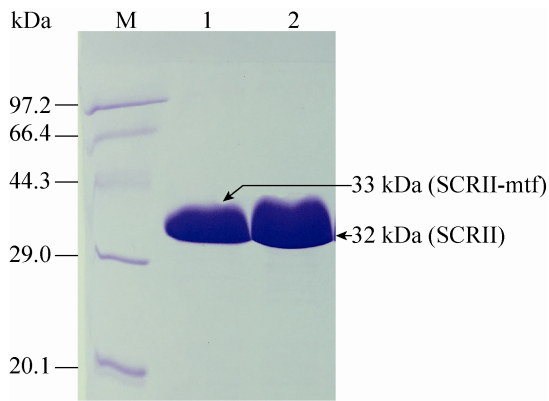


图 2. SCRII 和 SCRII-mtf 的纯化

Figure 2. Purification of SCRII and SCRII-mtf. M: protein molecular weight marker (Low); lane 1: the purified SCRII-mtf; lane 2: the purified SCRII.

二聚体(约 66 kDa)和三聚体(约 99 kDa), 还有少量多聚体生成。此外, 在 SCRII-mtf 条带的下方还有两条带生成, 根据大小以及文献报道<sup>[19]</sup>, 我们推测是切去末尾甘氨酸的 SCRII-GGGGSLPET 和环化的 SCRII-GGGGSLPET。随着反应温度的升高, 连接产物的产量逐渐增加, 但当温度高于 25 °C 时产物有所减少, 因此确定 25 °C 为最适连接温度。在 25 °C 下进一步进行反应条件优化, 在 12、24 和 36 h 分别用 SDS-PAGE 鉴定连接产物的变化,

结果发现随着时间的延长, 连接产物的量逐渐增加, SCRII-mtf 的量逐渐减少, 直到 36 h 时几乎所有的 SCRII-mtf 被消耗, 转化为连接产物, 同时 SCRII-GGGGSLPET 和环化的 SCRII-GGGGSLPET 也几乎被消耗完, 此时连接产物的产量达到最多, 因此确定连接时间为 36 h。作为对照, 在同等条件下连接 36 h 的 SCRII 经蛋白电泳检测无任何连接产物生成。SCRII 寡聚体经凝胶柱 Superdex 200 去除 SrtA 蛋白和残余的少量 SCRII-mtf 蛋白, 得到的寡聚体混合物用于酶学性质的测定。

#### 2.4 SCRII 寡聚体的温度和 pH 稳定性显著提高

SCRII、SCRII-mtf 和 SCRII 寡聚体的活性在同一条件下进行测定, SCRII 对 2-HAP 的比活为 6.3 U/mg, 与之前文献当中报道的结果基本一致<sup>[7]</sup>; 而在 C 端添加了 GGGGSLPETGG 序列的 SCRII-mtf 的比活较之有所增加, 为 8.7 U/mg; SCRII 寡聚体对 2-HAP 的活性比较高, 为 38.5 U/mg, 与 SCRII 相比提高了 6 倍。

在 20–70 °C 范围内, SCRII 和 SCRII-mtf 随着温度的升高, 活性逐渐增加, 在 35 °C 时酶活最高, 此后随温度升高, 活性迅速降低(图 4-A); 在

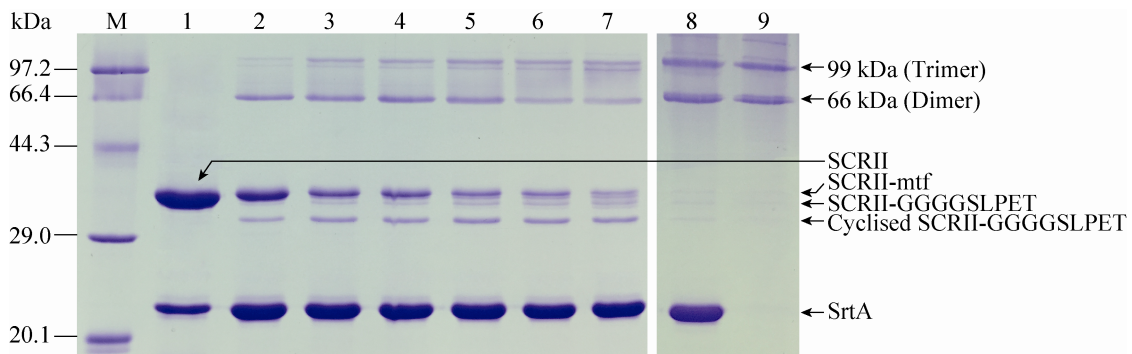


图 3. SrtA 介导的 SCRII 寡聚体的形成

Figure 3. SrtA-mediated oligomerization of SCRII. M: protein molecular weight marker (Low); lane 1: SrtA+SCRII for 8 h at 25 °C; lane 2–7: SrtA+SCRII-mtf for 8 h at 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C, respectively; lane 8: SrtA+SCRII-mtf for 36 h at 25 °C; lane 9: the purified SCRII oligomers.

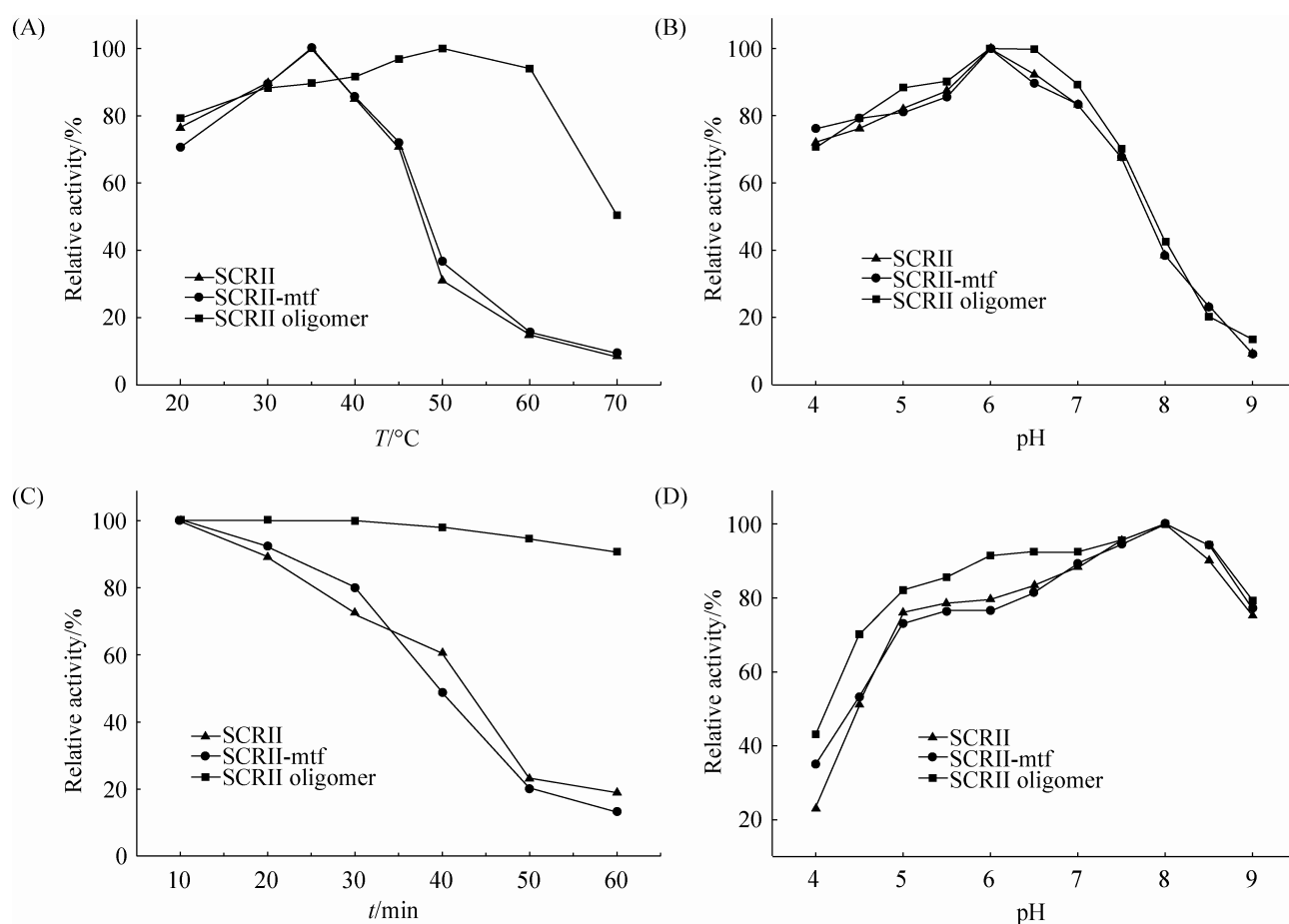


图 4. SCR II、SCR II-mtf 和 SCR II 寡聚体的酶学性质

Figure 4. The enzyme characteristics of SCR II, SCR II-mtf and SCR II oligomers. A: the optimal temperature of SCR II, SCR II-mtf and SCR II oligomers towards 2-HAP reduction (pH 6.0); B: the optimal pH value of SCR II, SCR II-mtf and SCR II oligomers towards 2-HAP reduction (35 °C); C: the thermostability of SCR II, SCR II-mtf and SCR II oligomers (pH 6.0); D: the pH stability of SCR II, SCR II-mtf and SCR II oligomers (4 °C).

20–50 °C 范围内, SCR II 寡聚体随着温度升高, 相对酶活增加, 在 50 °C 时相对酶活最高, 温度高于 60 °C 时活性迅速降低。SCR II 和 SCR II-mtf 在 pH 6.0 时酶活最高, 而 SCR II 寡聚体在 pH 6.0 和 pH 6.5 均具有最高活性(图 4-B)。

温度稳定性测定结果如图 4-C 示, SCR II 和 SCR II-mtf 在 50 °C 放置 10 min 后, 能够保留原始酶活的 80%, SCR II 寡聚体在 50 °C 放置 1 h, 活性仍旧维持在 90% 以上。在 pH 5.0–9.0 的范围内

放置 24 h 后, 3 种酶的酶活性都能保持 75% 以上, 但在同等条件下, SCR II 寡聚体的 pH 稳定性明显高于其他两种酶(图 4-D)。

## 2.5 蛋白变性实验进一步证实 SCR II 寡聚体热稳定性显著提高

随着波长的变化, SCR II、SCR II-mtf、SCR II 寡聚体的摩尔椭圆度显示出相似的变化趋势, 并且分别在 190 和 209 nm 处出现波峰和波谷, 说明三种蛋白具有非常相近的二级结构, 识别序列的

添加以及寡聚化并没有改变 SCRII 的蛋白结构。蛋白变性温度是蛋白二级结构解螺旋达到最大速率时所对应的温度，即变性曲线最大斜率处所对应的温度。随着温度的升高，SCRII 和 SCRII-mtf 在 45 °C 处开始解螺旋，通过计算曲线的最大斜率，得出二者的  $T_m$  值为 49.6 °C 和 50.3 °C。SCRII 寡聚体在 55 °C 左右开始丧失二级结构，经计算  $T_m$  值为 60.1 °C (图 5)，说明 SCRII 经寡聚化后，变性温度提高了近 10 °C，蛋白变性实验进一步证实 SCRII 寡聚体热稳定性显著提高。

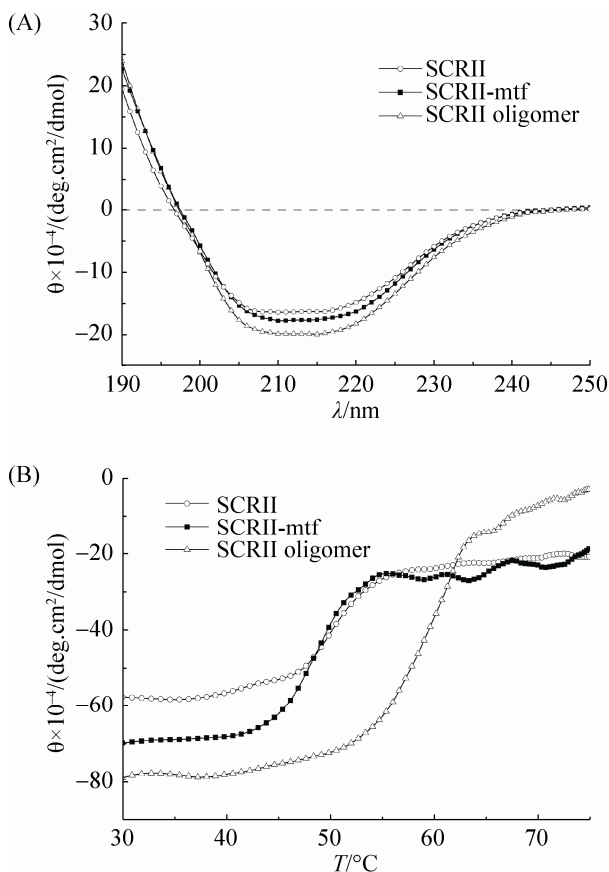


图 5. 圆二色谱分析 SCRII、SCRII-mtf 和 SCRII 寡聚体的二级结构含量(A)和变性温度(B)

Figure 5. Circular dichroism analysis of secondary structures (A) and denaturation temperature (B) for SCRII, SCRII-mtf and SCRII oligomers.

## 2.6 SCRII 寡聚体显著提高不对称转化(S)-PED 效率

以 2-HAP 为底物，NADPH 为辅酶，SCRII、SCRII-mtf 和 SCRII 寡聚体作为催化剂分别进行不对称转化反应。在 SCRII 寡聚体最适反应条件 35 °C 和 pH 6.0 下，在反应的不同时间段对转化产物进行取样分析。结果如图 6 所示，SCRII 寡聚体在 2 h 内的产率即达到了 90% 以上，在 3 h 左右能够将 5 g/L 的 2-HAP 完全转化，产物(S)-PED 的光学纯度高达 100%，而原始酶 SCRII 和 SCRII-mtf 均在 8 h 左右才将底物完全转化。SCRII 寡聚体转化时间比 SCRII 和 SCRII-mtf 缩短了 2.7 倍。另外，我们尝试了三种酶催化转化 10 g/L 2-HAP，结果如表 2 中所示，SCRII 寡聚体能够在 8 h 左右将 2-HAP 几乎完全转化，(S)-PED 的产率和光学纯度均为 100%，而 SCRII、SCRII-mtf 转化产率低于 50%。

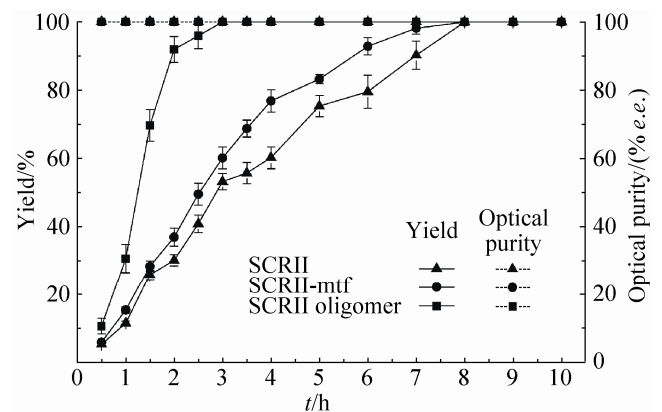


图 6. SCRII、SCRII-mtf 和 SCRII 寡聚体不对称转化(S)-PED

Figure 6. Asymmetric transformation of (S)-PED by SCRII, SCRII-mtf and SCRII oligomers. The data represented three independent experiments and standard errors were not more than 5%.



表 2. SCRII、SCRII-mtf 和 SCRII 寡聚体催化转化 (S)-PED

Table 2. The biotransformation of (S)-PED by SCRII, SCR-mtf and SCRII oligomers

Enzymes	Optical purity/(% e.e.)	Yield/%
SCRII	100.00±0.00	41.20±1.15
SCRII-mtf	100.00±0.00	46.10±1.79
SCRII oligomers	100.00±0.00	98.30±0.83

2-HAP concentration and reaction time is 10 g/L and 8 h, respectively. The data represented three independent experiments and standard errors were not more than 5%.

### 3 讨论

羧基还原酶是一种具有高度化学、区域和立体选择性的生物催化剂, 可以用于催化合成许多不同种类的手性化合物<sup>[20-21]</sup>, 这些化合物可作为中间体可用于制备农药、医药和功能材料等<sup>[22-24]</sup>。本研究中的 SCRII 催化 2-HAP 生成的 (S)-PED 是液晶材料中不可缺少的手性添加剂<sup>[7]</sup>。前期研究发现重组 SCRII 催化 2-羟基苯乙酮的活性较低, 及时更换蛋白表达的宿主细胞, 如在酿酒酵母、毕赤酵母中异源表达<sup>[25]</sup>和近平滑假丝酵母中原位表达<sup>[8]</sup>, 酶催化转化 (S)-PED 的周期均较长, 至少 24 h 以上。因此, 本研究从蛋白质工程角度出发, 对 SCRII 进行改造, 以此来提高酶的稳定性和催化效率。目前常用的蛋白质改造的方法主要有两种, 即定向进化和理性设计。定向进化的完成需要建立在大量随机突变和高通量筛选方法的基础上, 如 Zhao 等通过易错 PCR 获得了羧基还原酶 *ChKRED<sub>20</sub>* 的突变文库, 通过在高温下孵育后检测酶活, 最终成功筛选得到了热稳定性提高的突变酶<sup>[26]</sup>; 理性设计是基于对某一蛋白质的结构与功能之间的具体关系, 实施定点突变或饱和突变来获得性能提高的突变酶, 如 Luo 等采用同源建模

和分子对接锁定了羧基还原酶 KIAKR 的 Tyr295 和 Trp296, 通过实施点饱和突变, 最终成功获得了功能强化的突变酶<sup>[27]</sup>。然而氧化还原酶的高通量筛选方法是定向进化技术应用的瓶颈, 而对于缺乏足够蛋白结构信息的氧化还原酶来讲, 理性设计的工作量较大且成功率不高。因此, 我们借助于 sortase 的转肽作用来构建寡聚酶, 在不改变 SCRII 结构的基础上, 构建新型共价聚合的寡聚酶提高酶的催化活性和热稳定性。

sortase 由于其识别序列较短, 不容易导致蛋白质活性的丧失, 广泛应用于蛋白质的修饰<sup>[13-14]</sup>。但迄今为止, sortase 很少用于蛋白质与蛋白质之间的分子连接, 分析其主要原因可能是由于蛋白质的分子量较大, 连接成功率比较低等因素限制了它在蛋白质连接研究中的发展。通过对 SCRII 的序列进行分析, 发现在其 N 端存在一个天然甘氨酸, 因此只需在其 C 端添加 SrtA 的识别序列, 即 LPXTG(X 为任意氨基酸)序列, 随后依靠 SrtA 的转肽作用便能够介导寡聚反应的发生。对于识别序列的添加, 一方面, 为了排除蛋白质的位阻效应, 使该识别序列充分暴露出来能够被 SrtA 顺利切开, 另一方面, 也为了避免引入的 LPETG 序列对 SCRII 的活性造成影响, 因此, 有必要在该识别序列前面添加 GGGGS 柔性多肽, 并在其后面再添加了一个 G, 使整个识别序列可以暴露在蛋白质表面并且不影响 SCRII 的正确折叠。值得一提的是, 由于 C 端距离 SCRII 酶的活性区域较远, GGGGS 柔性序列添加至 LPETGG 识别序列的前段, 使得 SCRII 酶活性未受影响, 同时增加了酶蛋白的柔韧性, 从而导致添加 GGGGSLPETGG 的 SCRII-mtf 酶活比原始酶更高。此外, SCRII 寡聚体的高度聚合必然离不开

sortase 介导反应条件的优化,主要包括两个方面,即连接温度和反应时间。首先,在不同温度下 sortase 介导反应 8 h,通过观察连接产物的量,确定了 25 °C 时连接率最佳,随后,在 25 °C 下进行连接反应时间的摸索,发现在 36 h 时几乎所有的单体全部转化为 SCRII 寡聚体,主要为二聚体和三聚体。寡聚体催化 2-HAP 酶活性比原始酶有显著提高,说明以共价键连接的多聚体的催化效率比单体酶要高;与原始酶相比,寡聚体的温度稳定性显著提高,圆二色谱分析结果进一步证实 SCRII 寡聚体变性温度比 SCRII 提高了 10 °C 左右。不对称转化实验结果表明寡聚体不对称催化 2-HAP 转化(S)-PED 的时间大大缩短,在 3 h 内完全转化 5 g/L 的 2-HAP,相比重组大肠杆菌(S)-羧基还原酶 II 全细胞催化时间缩短了 16 倍<sup>[6]</sup>,并且在 8 h 内几乎完全转化 10 g/L 2-HAP,表明寡聚体能够耐受更高的底物浓度。综上所述,本研究首次将 sortase 介导氧化还原酶分子连接及其手性催化反应,成功构建了 SCRII 寡聚体,以共价键连接的寡聚体具有更好的热稳定性和催化活性,sortase 介导的蛋白质连接也为羧基还原酶的改造提供了一个全新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] Panke S, Held M, Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(4): 272–279.
- [2] Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A. Biocatalytic ketone reduction — a powerful tool for the production of chiral alcohols — part II: whole-cell reductions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(2): 249–255.
- [3] Emmanuel MA, Greenberg NR, Oblinsky DG, Hyster TK. Accessing non-natural reactivity by irradiating nicotinamide-dependent enzymes with light. *Nature*, 2016, 540(7633): 414–417.
- [4] Wenda S, Illner S, Mell A, Kragl U. Industrial biotechnology—the future of green chemistry?. *Green Chemistry*, 2011, 13(11): 3007–3047.
- [5] Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 2012, 485(7397): 185–194.
- [6] Zhang YP, Wang HL, Chen LF, Wu K, Xie JL, Wei DZ. Efficient production of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by a novel alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus curieae* S1L19. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2016, 134: 51–60.
- [7] Zhang RZ, Geng YW, Xu Y, Zhang WC, Wang SS, Xiao R. Carbonyl reductase SCRII from *Candida parapsilosis* catalyzes anti-Prelog reaction to (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol with absolute stereochemical selectivity. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 483–489.
- [8] Li YH, Zhang RZ, Xu Y, Xiao R, Wang L, Zhou XT, Liang HB, Jiang JW. Efficient bioreduction of 2-hydroxyacetophenone to (S)-1-phenyl-1, 2-ethanediol through homologous expression of (S)-carbonyl reductase II in *Candida parapsilosis* CCTCC M203011. *Process Biochemistry*, 2016, 51(9): 1175–1182.
- [9] Mazmanian SK, Liu G, Hung TT, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 1999, 285(5428): 760–763.
- [10] Marraffini LA, DeDent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(1): 192–221.
- [11] Perry AM, Ton-That H, Mazmanian SK, Schneewind O. Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus* — III. Lipid II is an *in vivo* peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(18): 16241–16248.
- [12] Antos JM, Truttman MC, Ploegh HL. Recent advances in sortase-catalyzed ligation methodology. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 38: 111–118.
- [13] Antos JM, Miller GM, Grotenbreg GM, Ploegh HL. Lipid modification of proteins through sortase-catalyzed transpeptidation. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(48): 16338–16343.

- [14] Steinhagen M, Zunker K, Nordsieck K, Beck-Sickingher AG. Large scale modification of biomolecules using immobilized sortase A from *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(12): 3504–3510.
- [15] Massa S, Vikani N, Betti C, Ballet S, Vanderhaegen S, Steyaert J, Descamps B, Vanhove C, Bunschoten A, van Leeuwen FWB, Hernot S, Caveliers V, Lahoutte T, Muyldermans S, Xavier C, Devoogdt N. Sortase A-mediated site-specific labeling of camelid single-domain antibody-fragments: a versatile strategy for multiple molecular imaging modalities. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2016, 11(5): 328–339.
- [16] Mao HY, Hart SA, Schink A, Pollok BA. Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(9): 2670–2671.
- [17] Zhang RZ, Zhu GY, Zhang WC, Cao S, Ou XJ, Li XM, Bartlam M, Xu Y, Zhang XC, Rao ZH. Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-Prelog stereospecificity. *Protein Science*, 2008, 17(8): 1412–1423.
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [19] Parthasarathy R, Subramanian S, Boder ET. Sortase A as a novel molecular “stapler” for sequence-specific protein conjugation. *Bioconjugate Chemistry*, 2007, 18(2): 469–476.
- [20] Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the myths — biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003, 299(5613): 1694–1697.
- [21] Chadha A, Venkataraman S, Preetha R, Padhi SK. *Candida parapsilosis*: a versatile biocatalyst for organic oxidation-reduction reactions. *Bioorganic Chemistry*, 2016, 68: 187–213.
- [22] Cao L, Lee JT, Chen W, Wood TK. Enantioconvergent production of (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol from styrene oxide by combining the *Solanum tuberosum* and an evolved *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolases. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(3): 522–529.
- [23] Carey JS, Laffan D, Thomson C, Williams MT. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2006, 4(12): 2337–2347.
- [24] Cui YM, Lin Y, Xu LW. Catalytic synthesis of chiral organoheteroatom compounds of silicon, phosphorus, and sulfur via asymmetric transition metal-catalyzed C-H functionalization. *Coordination Chemistry Reviews*, 2017, 330: 37–52.
- [25] Zhang RZ, Xu Y, Xiao R, Wang L, Zhang BT. Optimized expression of (*S*)-carbonyl reductase in *Pichia pastoris* for efficient production of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(8): 873–879.
- [26] Zhao FJ, Pei XQ, Ren ZQ, Wu ZL. Rapid asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate using a thermostabilized mutant of ketoreductase *ChKRED<sub>20</sub>*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(8): 3567–3575.
- [27] Luo X, Wang YJ, Shen W, Zheng YG. Activity improvement of a *Kluyveromyces lactis* aldo-keto reductase KlAKR via rational design. *Journal of Biotechnology*, 2016, 224: 20–26.

## Sortase A-mediated oligomers of (*S*)-carbonyl reductase II suitable for biotransformation of (*S*)-phenyl-1, 2-ethanediol

Kunpeng Li, Rongzhen Zhang<sup>\*</sup>, Jing Li, Haiyan Liu, Lixian Zhou, Lihong Li, Yaohui Li, Yang Gu, Jinzhu Wang, Jiajia Shao, Mingqin Quan, Ziyu Qiu, Yan Xu

Key Laboratory of Industrial Biological, Ministry of Education, School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] To obtain oligomers of (*S*)-carbonyl reductase II with strong activity and stability, we used sortase A from *Staphylococcus aureus* as molecular “stapler” to conjugate (*S*)-carbonyl reductase II. The (*S*)-carbonyl reductase II oligomers efficiently catalyzed the biotransformation of 2-hydroxyacetophenone to (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol. [Methods] We cloned sortase A gene from *S. aureus* genome and expressed it in *Escherichia coli*. The recombinant enzyme was purified through Ni-affinity and gel filtration chromatography. Meanwhile, we added GGGGSLPETGG to C terminus of (*S*)-carbonyl reductase II using genetic techniques, and purified recombinant SCRII-GGGGSLPETGG to homogeneity. We determined the optimal reaction conditions of sortase A-mediated ligation of (*S*)-carbonyl reductase II to oligomers. The enzyme characteristics of the generated oligomers were studied. And the oligomers-catalyzed biotransformation efficiency of (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol was further detected. [Results] Oligomers showed a specific activity of 38.5 U/mg, 6-fold increase compared to (*S*)-carbonyl reductase II. The optimal temperature and pH of ligation reaction by oligomers were 35 °C and 6.0 respectively. The relative activity was maintained over 90% at 50 °C for 1 hour. Denaturation test showed that the denaturation temperature of oligomers was 60.1 °C, 10 °C higher than that of (*S*)-carbonyl reductase II. Biotransformation results indicated that oligomers completely transformed 5 g/L 2-hydroxyacetophenone within 3 hours to generate (*S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol with an optical purity of 100%. With oligomers, we reduced transformation duration for 16 folds compared to that of recombinant *E. coli*-(*S*)-carbonyl reductase II cells. [Conclusion] This work first described sortase A-mediated the ligation of oxidoreductase and significantly improved catalytic efficiency and thermal stability of enzyme, suggesting sortase had great potential application in chiral synthesis.

**Keywords:** Sortase A, molecular ligation, oligomer, oxidoreductase, chiral catalysis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370100, 31670070), by the Program for Advanced Talents within Six Industries of Jiangsu Province (2015-SWYY-010), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51409B), by the Program for New Century Excellent Talents in Universities (NCET-13-0833) and by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85864112; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 29 December 2016; Revised: 15 March 2017; Published online: 5 April 2017